

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19603005  
 研究課題名（和文）神経因性疼痛の発症に関与する P2X4 遺伝子発現制御メカニズムの解明  
 研究課題名（英文）The mechanism underlying P2X4 receptor regulation  
 in the neuropathic pain state.  
 研究代表者  
 齊藤 秀俊 (Saitoh Hidetoshi)  
 九州大学・薬学研究院・助教  
 研究者番号：90444794

## 研究成果の概要：

現在、世界には「神経障害性疼痛」に苦しむ患者が千数百万人も存在し、救われ難い痛み  
 に苦しんでいる。我々の研究チームは、脊髄のミクログリア細胞に過剰発現する P2X4 受容体  
 が神経因性疼痛発症課程における重要な分子であることを提示しているが、P2X4 受容体の  
 過剰発現メカニズムは不明であった。本研究は、P2X4 受容体遺伝子はその上流領域配列  
 によってレチノイン酸受容体の標的遺伝子となる潜在的可能性を示し、このメカニズム  
 によって脊髄ミクログリアにおける P2X4 受容体発現増強が引き起こされ、如いては病態  
 の形成に関与していることを示すものである。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：痛み、神経科学、転写調節

## 1. 研究開始当初の背景

痛みは危険から回避するための大切な感覚  
 情報であるが、行き過ぎた痛みは抑えなけ  
 ばならない。現在、世界にはモルヒネも効か  
 ない痛み「神経因性疼痛」等に罹患する患者  
 が千数百万人も存在し、救われ難い痛み  
 に苦しんでいる。その原因は、ガンの浸潤、糖尿  
 病性神経炎、外科手術の不手際、ヘルペスな  
 ど様々であるが、詳細な発症メカニズムは不

明である。このような状況の中、我々の研究  
 チームは、「末梢神経損傷により脊髄内ミク  
 ログリアでイオンチャネル型 ATP 受容体サ  
 ブタイプ P2X4 が過剰発現し、P2X4 刺激が  
 ミクログリアからの BDNF 放出を促し、そ  
 の BDNF が抑制性伝達物質 GABA の作用を  
 興奮性に変えてしまい、結果として強い痛み  
 を引き起こす」という神経因性疼痛の新しい  
 発症メカニズムを提示した。これは極めて斬

新たなアイデアとなり、P2X4 を中心にした新しい治療法や治療薬の開発が大いに期待されている。しかしながら、なぜ P2X4 受容体が過剰発現するのかはまったく不明である。

## 2. 研究の目的

私はすでに P2X4 の仲間である P2X2 遺伝子発現制御メカニズムについて核内受容体 RXR が深く関与することを報告した。一方、P2X4 遺伝子についても予備試験的に解析した結果、P2X4 遺伝子上流配列にレチノイン酸応答配列が予測された。従って、P2X4 も RXR 様の核内受容体によって発現が制御されている可能性が濃厚であるがその詳細については不明である。以上の背景に基づき、本研究では P2X4 遺伝子の発現が RXR 様の核内受容体によって制御されていることを明らかにし、さらにその生理的意義および神経因性疼痛の発症との関係を明確にすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

1) P2rx4 mRNA の相同配列検索から P2rx4 上流領域のゲノム上の位置を推定し、Wistar ラット尾より単離したゲノム DNA を鋳型として P2rx4 転写開始部位から上流の配列をクローニングし、配列内に存在すると推定される転写調節因子結合部位を web 上のプログラム (TESS : Transcription Element Search System, <http://www.cbil.upenn.edu/tess/>) を用いて検索する。

2) クローニングした全長の配列、又は推定レチノイン酸応答配列を除去した配列を pGL3 luciferase reporter vector (Promega) に組み込み、これを遺伝子導入 1321N1 アストロサイトーマ細胞を用いて、レチノイン酸で刺激した後に、発現誘導されるホタルルシフェラーゼ活性を Dual-Glo luciferase assay system (Promega) を用いて測定する。これによってクローニングした P2rx4 5' 上流配列のプロモーター活性を検討する。

3) ラット初代培養ミクログリアでのレチノイン酸刺激による P2X4 mRNA 発現量の測定ミクログリアをレチノイン酸で刺激後、total RNA 中に含まれる P2X4mRNA の発現量を定量的リアルタイム RT-PCR 法によって測定する。

4) レチノイン酸あるいはその溶媒を処置した初代培養ミクログリアからタンパク抽出を行い、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングによってその比較定量を行う。

5) カバーガラス上で培養したミクログリアに 9cisRA を処置し、24 時間後にカルシウム指示薬 fura2-AM を用いて ATP (10<sup>-6</sup> M) によって誘起される [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇測定する。

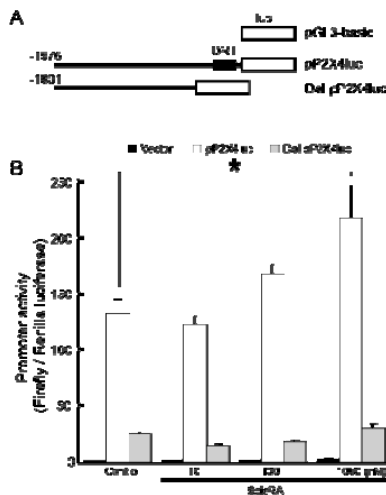
6) 神経因性疼痛モデル動物 (Chung モデル) においてレチノイン酸経口投与によるアロディニア症状の発現変化を痛み閾値の経時的な測定によって行う。また、神経損傷側の脊髄内に発現している P2X4 タンパク質量をウェスタンブロッティング法により定量する。

7) 神経因性疼痛発症過程における RXR アンタゴニスト HX531 の効果  
100<sup>-6</sup> M の HX531 (PBS (-) 溶液、0.5% DMSO) を 5<sup>-1</sup> 髄腔内へ投与し、痛み行動への影響を検討する。投与は 1 日 2 回 (10:00 ~, 20:00 ~) 行い、von Frey filament を用いた痛み行動を経時的に測定する。

## 4. 研究成果

### 1) P2X4 受容体遺伝子上流領域にレチノイン酸応答配列が存在する。

ラットゲノムよりクローニングした P2X4 遺伝子の 5' 上流領域を用いてレポーターアッセイを行った結果、この配列は 9-cis レチノイン酸処置に反応し、下流遺伝子 (ルシフェラーゼ) の転写活性の増強を示した。この効果は濃度依存的な反応であった。また、予測されたレチノイン酸応答配列を除去したプラスミドではレチノイン酸による転写増強効果はみられなかった。

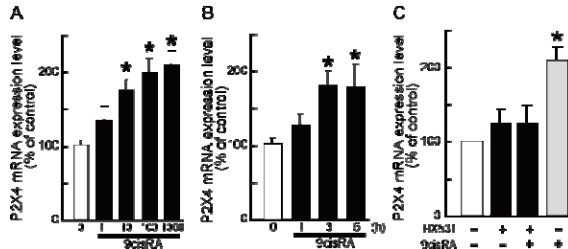


### 2) 9-cis レチノイン酸処置がミクログリアの P2X4 受容体発現を増加させる。

初代培養ミクログリア細胞を用いた実験において、9-cis レチノイン酸の処置は時間・濃度依存的に P2X4 受容体 mRNA の発現量を増加させた。またこの増加はレチノイン酸

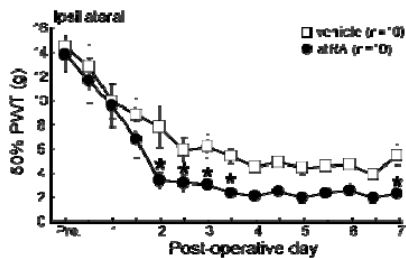
受容体の一つである RXR のアンタゴニスト (HX531) によって抑制されることが明らかになった。

さらに9-cis レチノイン酸処置によってミクログリアの P2X4 受容体タンパク量の増大もウェスタンブロッティング法によって確かめられた。



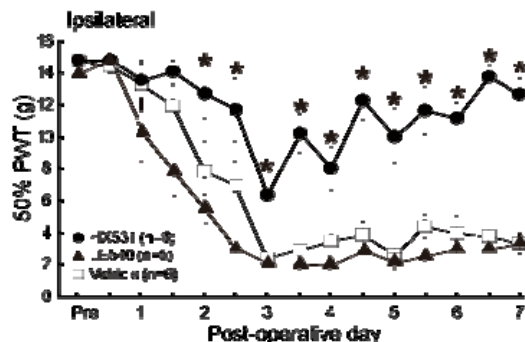
3) レチノイン酸経口投与ラットでは脊髄神経傷害後のアロディニアの形成が促進される。

末梢神経傷害後に観察されるアロディニア症状はレチノイン酸を一日一回連続で経口投与したラットでは有意にその悪化の度合いが促進していることが明らかになった。また、この時、脊髄での P2X4 受容体発現量はレチノイン酸投与群で優位に増大していた。



4) レチノイン酸受容体に対するアンタゴニストの髄腔内投与によって脊髄神経傷害後のアロディニア症状が回復した。

末梢神経傷害後に観察されるアロディニア症状はレチノイン酸受容体の一つである RXR に対するアンタゴニスト (HX531) を連続的に髄腔内投与することによって回復させることができた。また、これらの痛み行動と相関して脊髄での P2X4 受容体タンパク質発現量の変化が観察された。



以上より、末梢神経傷害時にレチノイン酸受容体を介したシグナルによって、活性化した脊髄ミクログリアの P2X4 受容体発現が増強され、アロディニア症状を形成することが予想された。これらの結果はミクログリアが関与する神経因性疼痛に対し新たな治療標的分子を提起するものである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Kohsaka S, Inoue K.

“P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury.”

Journal of Neuroscience, 28(4949-4956)2008

Inoue K, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H.

“Modification of neuropathic pain sensation through microglial ATP receptors.”

Purinergic Signaling. 3(311-316)2007.

Tsuda M, Ueno H, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Inoue K.

“Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling.”

Glia. 56(378-86)2008.

Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Masuda T, Toyomitsu E, Tezuka T, Yamamoto T, Inoue K.

“Lyn tyrosine kinase is required for P2X(4) receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury.”

Glia, 56(50-58)2008

Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Koga Y, Tsuda M, Inoue K.

“Activation of P2X7 receptors induces CCL3 production in microglial cells through transcription factor NFAT.”

Journal of Neurochemistry, 108(115-125)2008

Tsuda M, Toyomitsu E, Kometani M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K.

“Mechanisms underlying fibronectin-induced upregulation of P2XR expression in microglia: distinct roles of PI3K-Akt and

MEK-ERK signaling pathways.”  
Journal of Cellular and Molecular  
Medicine, in press.

〔学会発表〕(計 3 件)

**齊藤秀俊**、津田誠、井上和秀  
神経因性疼痛発症メカニズムにおける脊髄  
ミクログリア P2Y12 受容体の関与  
第 31 回日本神経科学大会

**齊藤秀俊**、津田誠、井上和秀  
神経因性疼痛発症過程における P2Y12 受容体  
の関与  
第 81 回日本薬理学会年会

**齊藤秀俊**、津田誠、小泉修一、井上和秀  
P2X4 受容体発現制御を介したレチノイン酸  
シグナルの神経因性疼痛への関与  
第 80 回日本薬理学会年会

〔その他〕

ホームページ等

<http://210.233.60.66/~yakkou/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

**齊藤 秀俊** (Saitoh Hidetoshi)  
九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号 : 90444794